



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

“Eficiencia de las bacterias *Pseudomonas SP* y *Dietziaceae* para la degradación de  
Tereftalato de Polietileno, 2019”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Ingeniera Ambiental**

**AUTORA:**

Karen Estefany Chugnas Polanco (ORCID: 0000-0002-3191-4847)

**ASESOR:**

Dr. Fernando Antonio Sernaque Auccahuasi (ORCID:0000-0003-1485-5854)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Tratamiento y Gestión de los Residuos

**LIMA-PERÚ**

2019

Dedicatoria:

El presente trabajo está dedicado a mis padres Emigdio y Azucena, por ser mi soporte durante todo el proceso formativo, además de su aliento, sacrificio y dedicación.

Agradecimientos:

A mis amigos y familiares por su apoyo y conocimientos. Al Dr. Fernando Antonio Sernaque Auccahuasi por la asesoría y constante ayuda y a la Ing. Angélica Ambriz Luna por el apoyo con la metodología.

## PÁGINA DEL JURADO

Declaratoria de autenticidad

Yo, **Karen Estefany Chugnas Polanco** con DNI N° 73528528 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela Académica Profesional de Ingeniería Ambiental, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Lima, 03 de diciembre del 2019



.....  
**Karen Estefany Chugnas Polanco**  
DNI: 73528528

## ÍNDICE

<b>Dedicatoria.....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Página del Jurado... ..</b>	<b>iv</b>
<b>Declaratoria de autenticidad.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de cuadros .....</b>	<b>x</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Método .....</b>	<b>12</b>
2.1 Diseño de Investigación.....	12
2.1.1. Tipo de investigación .....	12
2.1.2. Diseño de la metodología.....	12
2.1.3. Enfoque de la investigación .....	12
2.2 Variables, Operacionalización .....	12
2.2.1. Variables.....	12
2.2.2. Operacionalización de variables .....	13
2.3 Población y muestra.....	15
2.3.1. Población .....	15
2.3.2. Muestra .....	15
2.3.2.1. Muestreo aleatorio simple.....	15
2.3.2.2. Criterios para la selección de la muestra.....	15
2.3.2.3. Toma de muestra .....	15
2.3.2.3.1. Bacteria <i>Dietziaceae</i> .....	15
2.3.2.3.2. Bacteria <i>Pseudomona sp.</i> .....	15
2.3.2.3.3. Residuos plásticos .....	16
2.3.2.4. Materiales para la toma de muestra .....	16
2.3.2.5. Materiales para la desinfección de la muestra.....	16

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	16
2.4.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	16
2.4.1.1. Técnicas.....	16
2.4.1.2. Insumos.....	16
2.4.1.3. Instrumentos.....	17
2.4.1.4. Protocolos.....	17
2.4.2. Validez y confiabilidad.....	17
2.4.2.1. Validez.....	17
2.4.2.2. Confiabilidad.....	17
2.5 Procedimiento experimental .....	18
2.5.1. Bacteria <i>Dietziaceae</i> .....	18
2.5.1.1 Preparación de medios de cultivo.....	18
2.5.1.1.1. Medio de cultivo Agar MacConkey.....	18
2.5.1.1.2. Medio de cultivo Agar Nutritivo.....	19
2.5.1.2. Preparación de la muestra.....	19
2.5.1.3. Siembra de bacterias por la técnica de extensión superficial.....	20
2.5.1.4. Incubación .....	21
2.5.1.5. Siembra de colonias de interés .....	21
2.5.2. Bacteria <i>Pseudomonas sp</i> .....	22
2.5.3. Tereftalato de polietileno .....	23
2.5.3.1. Corte de muestras.....	23
2.5.3.2. Desinfección de muestras.....	23
2.6 Método de análisis de datos .....	23
2.7 Aspectos éticos.....	24
<b>III. Resultados .....</b>	<b>25</b>
3.1. Resultados de la siembra de colonias de interés .....	25
3.2 Condiciones iniciales .....	25
3.2.1. Pesaje de placas.....	25
3.2.1.1. Pesaje de la muestra de PET.....	25

3.2.1.2. Pesaje de la placa con agar y población bacteriana .....	26
3.2.1.3. Pesaje de la placa con agar, población bacteriana y muestra de PET.....	27
3.2.2. Exposición de las bacterias al PET .....	28
3.3. Condiciones intermedias .....	29
3.4. Condiciones finales .....	30
3.5. Resultados de análisis estadístico en Minitab... ..	32
<b>IV. Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>V. Conclusiones .....</b>	<b>37</b>
<b>VI. Recomendaciones.....</b>	<b>38</b>
<b>VII. Referencias.....</b>	<b>39</b>
<b>VIII. Anexos.....</b>	<b>46</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Soluciones de cloruro de sodio al 0.9% para preparación de la muestra.....	19
Figura 2: Generación del inóculo.....	20
Figura 3: Soluciones de muestra de excreta de caballo de $10^{-1}$ hasta $10^{-4}$ .....	20
Figura 4: Desarrollo de la técnica de extensión superficial.....	21
Figura 5: Selección de la colonia de interés del agar nutritivo.....	22
Figura 6: Placa Petri con cultivo de bacteria <i>Pseudomona Sp.</i> .....	22
Figura 7: Resultados de la técnica de extensión superficial.....	25
Figura 8: Bacterias adheridas a la superficie del PET.....	29
Figura 9: Degradación de bacterias <i>Dietziaceae</i> a las 96 horas.....	30
Figura 10: Degradación final de PET para ambas bacterias.....	32

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Detalle de los instrumentos de laboratorio. ....	18
Cuadro 2: Ficha de observación.....	23
Cuadro 3: Detalle de los pesos de cada muestra de PET.....	26
Cuadro 4: Detalle del peso de la placa, agar y población bacteriana.....	27
Cuadro 5: Detalle del peso de la placa, agar, población bacteriana y PET.....	28
Cuadro 6: Detalle del peso inicial y final del PET a las 96 horas.....	29
Cuadro 7: Detalle final de pesaje del PET a los 7 días.....	31

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis se realizó con el objetivo de evaluar la eficiencia de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* en la degradación del Tereftalato de polietileno, la importancia de este estudio se debe a la comparación de dos géneros de bacterias potencialmente degradadoras de plástico según sus características específicas, el primer género es conocido y se han desarrollado diversas investigaciones con derivados del plástico, sin embargo el segundo género muy poco conocido fue elegido por su potencial en degradar hidrocarburos, al lograr identificar que género es más eficiente se podrán utilizar para realizar tratamientos con la finalidad de disminuir los residuos plásticos.

En la experimentación se realizaron pruebas en laboratorio con la finalidad de obtener las bacterias del género *Dietziaceae* por ser este no muy conocido y por lo tanto no comercial, caso contrario las bacterias *Pseudomonas sp* se obtuvieron comercialmente, posteriormente se realizó el procedimiento para obtención de las muestras, corte, limpieza y desinfección de las mismas. El PET fue expuesto directamente a las bacterias en las placas Petri, además se realizó el pesaje inicial y final para cada placa un total de 23, con el cual se obtuvo el porcentaje de degradación. Ambas especies fueron expuestas al PET por el periodo de 7 días, monitoreándose las primeras 96 horas las placas  $1R10^{-2}$ ,  $1R10^{-3}$ ,  $1R10^{-4}$  obteniendo un resultado máximo de 29.40% en el género *Dietziaceae*. Transcurridos los 7 días se realizó el pesaje final, donde el género *Dietziaceae* alcanzó un máximo de 40.03% de degradación, en cuanto a *Pseudomonas sp* el mayor porcentaje alcanzado fue de 19.20%. Finalmente se llegó a la conclusión de que ambas especies son eficientes en la degradación de tereftalato de polietileno siendo la especie predominante *Dietziaceae*.

Palabras clave: Tereftalato de polietileno, *Pseudomonas*, *Dietziaceae*, degradación.

## ABSTRACT

The present thesis work was carried out with the objective of evaluating the efficiency of the bacteria *Pseudomonas sp* and *Dietziaceae* in the degradation of Polyethylene Terephthalate, the importance of this study is due to the comparison of two genera of bacteria potentially degrading plastic according to their specific characteristics, the first genus is known and several investigations have been developed with plastic derivatives, however the second very little known genus was chosen for its potential to degrade hydrocarbons, to identify which genus is more efficient can be used to perform treatments in order to reduce plastic waste.

In the experimentation, laboratory tests were carried out in order to obtain the bacteria of the genus *Dietziaceae* because it is not well known and therefore not commercial, otherwise the bacteria *Pseudomonas sp* were obtained commercially, then the procedure for obtaining samples, cutting, cleaning and disinfection of the masses was carried out. The PET was exposed directly to the bacteria in the Petri dishes, in addition the initial and final weighing was carried out for each plate a total of 23, with which the percentage of degradation was obtained. Both species were exposed to PET for the period of 7 days, monitoring the first 96 hours the plates 1R10-2, 1R10-3, 1R10-4 obtaining a maximum result of 29.40% in the genus *Dietziaceae*. After 7 days the final weighing was carried out, where the genus *Dietziaceae* reached a maximum of 40.03% degradation, as for *Pseudomonas sp* the highest percentage reached was 19.20%. Finally, it was concluded that both species are efficient in the degradation of polyethylene terephthalate being the predominant species *Dietziaceae*.

Keywords: Polyethylene terephthalate, *Pseudomonas*, *Dietziaceae*, degradation.

## I. INTRODUCCIÓN

En nuestra sociedad es cada vez más frecuente el uso de plásticos, la población busca satisfacer sus necesidades sin considerar el daño que está ocasionando o la huella ecológica que este dejando a su paso, debido a ello es que nuestro planeta contiene un gran número de residuos de estos componentes, siendo uno de los más perjudiciales por su tiempo prolongado de duración en el medio ambiente.

La contaminación por plásticos es uno de los principales problemas por los que atraviesa nuestro planeta en la actualidad, este material ha sustituido en gran manera a los productos naturales gracias a sus características intrínsecas como lo son su resistencia a través del tiempo y costo de producción muy bajos (Syranidou et al, 2019, p.33), la industria química se ha encargado de fabricar una gran cantidad de polímeros que satisfacen las necesidades de la población (McKeen, 2019, p.1) haciéndola dependiente de ellos, sin embargo, el tiempo de vida útil no se justifica en comparación al tiempo que tarda en degradarse (Alania y Pérez, 2017, p.6) considerándose un peligro a nivel mundial. Pueden pasar cientos a miles de años en la tierra para que logre degradarse y mediante su estadía la contaminación con las sustancias que lo componen.

Vertus et al. (2017) menciona que existe una creciente preocupación a nivel mundial por los residuos sólidos (p.1), es por ello que es importante la investigación de nuevas alternativas de remediación (Gutiérrez, Flores y Villagómez, 2018, p.942), se han realizado diversos estudios buscando técnicas de remediación o tecnologías limpias siendo las más destacadas el uso de bacterias como lo mencionan Gómez y Oliveros (2016) donde afirman que entre las especies más utilizadas se encuentran las bacterias y el reino fungí por su acción enzimática que da como resultado H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, biomasa entre otros, lo que se quiere es que en la estructura química exista una pérdida, trayendo consigo disminución en el peso molecular (p.3), la degradación se da por acción de procesos físicos, químicos y biológicos o cualquier tratamiento al que se somete el producto compuesto por plástico (Meza, 2013, p. 19).

Según World Bank, EPA (2012) citado por Moharir y Kumar (2018) nos detallan que los plásticos representan un 10 – 13 % de los residuos a nivel mundial, los principales polímeros utilizados industrialmente son el polietileno (PE) y el polipropileno (PP).

Esto significa una enorme carga para nuestro planeta ya que carecen de flexibilidad para la biodegradación (p.3). Además, la acumulación de enormes cantidades de desechos compuestos por plástico ha aumentado, generando preocupaciones ecológicas y de salud por la alteración de la calidad de vida (Giacomucci et al., 2019, p.35) por lo que existe una urgente necesidad de implementar diversas y novedosas medidas que permitan mitigar los impactos de la contaminación por plásticos (Bonanno y Bonaca 2018, p.146).

Al respecto se realizaron diversos trabajos previos, Ambriz (2015) desarrolló una investigación que tuvo como principal objetivo la obtención de una cepa del género *Dietzia Sp*, y la evaluación de su capacidad para degradar el ácido tereftálico, un componente muy tóxico. De su experimentación obtuvo 3 cepas que luego de ser identificadas fueron sembradas en medio de cultivo líquido, cuya base fueron sales y ácido tereftálico como fuente de energía, la concentración fue de 250 mg/l. Para la evaluación del crecimiento de las bacterias y la degradación utilizó la espectroscopia UV- Visible con lecturas a 540 y 278 nm. Se realizaron pruebas con la finalidad de optimizar la degradación sometiendo a citrato de sodio antes de inocularlos en el medio de crecimiento con AT. Los resultados de su investigación fueron que la cepa A (placa A, caballo, agar cerebro corazón, dilución  $10^{-2}$ ) mostró mayor crecimiento microbiano en un medio a base de sales adicionado de ácido tereftálico. La degradación del AT no obtuvo valores estadísticos significativos en las cepas A y E (placa E, caballo, agar cerebro corazón, dilución  $10^{-2}$ ). La degradación más significativa fue la de la cepa C (Caballo, agar cerebro corazón, dilución  $10^{-4}$ ) donde se obtuvieron resultados del  $72.13 \pm 11.6$  mg/L (40.5%) y en la cepa A modificada que presentó  $94.52 \pm 10.6$  mg/L (42.1%). En términos generales la que obtuvo mayor degradación fue la cepa A modificada, ello en consecuencia del estrés a la que fue sometida con una concentración de ácido tereftálico de 3 g/l.

Así también, Bhatia et al. (2014) durante su investigación de degradación de polietileno de baja densidad (LDPE) nos detallan que obtuvieron su muestra del suelo del vertedero municipal, aislándose microorganismos indígenas. Utilizaron 0,2 g de polvo de LDPE adicionado a su medio de crecimiento para enriquecerlo, las bacterias potencialmente degradadoras fueron sometidas a un ensayo donde contenían láminas de LDPE en medio de crecimiento. De las pruebas de ensayo in vitro obtuvieron que luego de cuatro días las cuatro cepas resultaron con 5 %, 17.8 %, 0.9 %, 0.6 % como pérdida de peso. La lámina que presentó mayor degradación

fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido, termogravimetría y espectroscopía infraroja por transformada de Fourier, pudiéndose demostrar la eficiencia de la cepa de *Pseudomonas citronellolis*. Al comparar A1 y A2 se demostró que obtuvieron una mejor asimilación y una mayor eficiencia en la digestión de LDPE con respecto a B y C. La biodegradación se realizó por un periodo de 96 horas, con intervalos de 24 horas para registro de datos espectrofotométricos a 600 nm con cuatro cultivos de bacterias con medio de crecimiento adicionado con láminas de LDPE como suplemento, todos con el mismo peso. Se pesó inicialmente y durante los intervalos mencionados hasta lograr la fase estacionaria en los cultivos, con los datos se realizó el cálculo de pérdida de peso para cada cultivo donde se obtuvo que la degradación mayor fue lograda por el cultivo A2 con un total de 17,8%, seguidamente de consorcio con un total de 14,67% en tan solo cuatro días. El cultivo A1 arrojó un 5% de degradación, caso contrario y con un menor porcentaje se encontraron los cultivos B y C con 0,6% y 0,9%. En estudios previos se registraron pérdidas de peso del 20% durante un periodo de 120 días.

A su vez, Chiellini et al. (2006) desarrollo una investigación donde se evaluó desechos de PET del suelo, fueron utilizadas las *Pseudomonas sp* como potenciales degradantes evaluadas por medio de microscopia electrónica (SEM). El desarrollo consistió en cortar pequeñas escamas que fueron tratadas con rayos UV, calor y ácido nítrico para luego ser inoculadas con las bacterias. Las escamas fueron lavadas con agua destilada, luego se inocularon con un medio de caldo de nutrientes durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente, la muestra (botella) se obtuvo de una tienda, luego fue cortada en medidas de 0,5 x 0,5 aproximadamente y lavada con agua destilada. Se trataron con productos químicos durante 15 minutos hervidos a 1000C, además de radiación UV por 10 días y tratamiento térmico durante 15 minutos a 1000C. Las tiras de plástico fueron lavadas con etanol al 70% y para finalizar con agua destilada para ser sometido al horno por una hora a 500°C. Las *Pseudomonas sp* fueron inoculadas en medio de caldo de nutrientes por un mes. Se realizó la evaluación con un microscopio electrónico de barrido con la finalidad de descubrir cambios morfológicos en la superficie de la muestra. Mediante observación se identificó la aparición de grietas, agujeros, cristales y adhesión en la superficie del PET tratado, al ser comparado con el no tratado donde la superficie se encontraba lisa y sin cambios.

Como resultado se obtuvo que mediante la microscopia SEM se pudo demostrar colonias microbianas creciendo dentro de la superficie del tereftalato de polietileno, además cambios en su estructura como grietas y agachamientos en la muestra tratada con HNO<sub>3</sub>, degradación con una forma cristalizada en los copos de la muestra, en la muestra tratada con calor y HNO<sub>3</sub> se evidenció una superficie irregular y rugosa, la muestra tratada con UV, calor y HNO<sub>3</sub> demostró grietas, picaduras y degradación en forma de cavidad y cristal, la muestra tratada con calor, HNO<sub>3</sub>, UV e inoculada con las bacterias sufrió cambios observándose adhesión y formación de grietas en la superficie. Por lo tanto, se concluyó que las *Pseudomonas sp* podrían ser de suma vitalidad en la aceleración del proceso degradante del PET, también tienen la capacidad de adherirse en la superficie acelerando el proceso de degradación.

Además, Gómez y Oliveros en el 2016 en su investigación aislaron cepas con capacidad de utilizar el PET como única fuente de carbono, las mismas que fueron puestas en contacto con las láminas del material plástico en varios tubos de ensayo con un caldo que contenía medio mínimo mineral, éstos fueron llevados a la incubadora para luego ser medidos por pérdida de su peso. Mediante microscopía y observación directa se examinaron las características físicas de las láminas posteriormente a la incubación. El medio de cultivo que desarrollaron en la investigación fue a base de macro y micro nutrientes que son vitales para que se desarrollen las bacterias, se destaca que estos no tenían ninguna fuente de carbono adicional solo las láminas de PET. Las láminas fueron cortadas en medidas de 2 x 5 cm, fueron lavadas con agua y esterilizadas sometiéndolas a radiación UV por 30 minutos. Los tubos fueron sometidos a la incubadora por un periodo de 15 días con una temperatura de 37°C y a temperatura ambiente por un periodo de 160 días. Cada lámina fue pesada antes de ser introducida a los tubos con caldo nutritivo y al finalizar el periodo de incubación, el peso fue determinado por una balanza microanalítica. Como resultado se obtuvo que luego de 72 horas en incubación se pudo evidenciar una acumulación de partículas en la superficie del PET, la formación de una biopelícula sobre las láminas, se entiende que la degradación ha permitido la inserción de grupos hidrofílicos lo que ha facilitado que se fijen las bacterias y se realice el crecimiento de poblaciones microbianas utilizando el carbono como fuente para su alimentación. Las cepas con mayor pérdida de peso fueron las de D con un peso de 43,7 mg, luego la E con un peso de 1,1 mg y la C con un peso de 0,8 mg, al analizarse las tres replicas se puso en evidencia la utilidad



de la cepa D como un potencial degradante del plástico con un promedio en total de 14, 90 mg lo que prueba la capacidad de los bacilos Gram negativos para degradar PET.

Así mismo, Barbarán, Cabanillas y Rubio (2018) en su investigación aplican diferentes concentraciones de plástico en diferentes tiempos bajo condiciones de laboratorio, para la experimentación se usó 35 gr de PET en polvo que fueron extraídos de botellas de agua y que fue sometido a nueve tratamientos con concentraciones de  $18 \times 10^7$  UFC,  $36 \times 10^7$  UFC y  $9 \times 10^8$  UFC durante periodos de 15, 25 y hasta 35 días, realizando tres repeticiones para cada muestra teniendo como resultado que el mayor porcentaje de remoción se llevó a cabo en el tratamiento N° 9 donde se utilizó  $9 \times 10^8$  UFC durante un periodo de 35 días con un porcentaje de degradación de 19.93%. Se afirma que existe una relación directa entre el tiempo y la concentración de *Pseudomonas aeruginosa* con respecto a la biodegradación de PET, además la remoción depende mucho del tiempo en que el producto de plástico permanezca expuesto al factor de degradación, por lo cual el plástico necesita mayor tiempo de exposición para lograr resultados óptimos, por último, afirma que la concentración de microorganismos no es muy influyente en polímeros.

Por otro lado, Giacomucci et al. (2019) en su artículo científico menciona que el principal objetivo del estudio fue estudiar la capacidad de biodegradación de las cepas bacterianas *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas citronellolis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus* y *Chelatococcus daeguensis* con muestras de polietileno, polipropileno, películas de poliestireno y cloruro de polivinilo. El examen preliminar que se realizó en la selección de *P. citronellolis* y *B. flexus* arrojó que estas dos especies serían potenciales degradadoras de película de PVC, luego de la experimentación en matraces de 2 litros, después de 45 días de incubación se observó que en el análisis de la cromatografía de exclusión molecular mostró una disminución del peso molecular promedio del PVC en un 10% debido a la incubación de *P. Citronellolis* atacando las cadenas de polímeros aparentemente y formando una película biológica en la superficie de los plásticos lo que ocasionó modificaciones en el FTIR. La biodegradación de PVC de desecho, demostró una disminución del peso gravimétrico del 19% luego de 30 días de incubación. Se logró demostrar que ambas cepas degradan aditivos de Policloruro de vinilo en bajo porcentaje.

Las *Pseudomonas* son un género perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, conocidas por sus características y capacidad de fijación de nitrógeno, se han utilizado en investigaciones filogenéticas, así como en la discriminación de especies, también es utilizado como un marcador taxonómico útil. Entre otras características son móviles por varios polares, quimiorganotróficos y no necesitan de factores de crecimiento orgánico. Generalmente son oxidasas positivas y catalasas positivas, su tolerancia a los ácidos es muy baja y se dificulta su crecimiento con un pH menor a 4.5. Dicho género tiene una diversidad que demuestra su variedad de capacidades metabólicas, su enorme distribución ecológica, así como su capacidad para adaptarse a diferentes ambientes. Las capacidades benéficas de este género son sumamente extensas, utilizadas para la descomposición de carbono por sus características biodegradantes, con habilidades como la descomposición de contaminantes ambientales peligrosos, fuentes de residuos orgánicos tóxicos como lo son los hidrocarburos aromáticos o el petróleo. (Dood, 2014, p.244). Estos microorganismos tienen una gran tolerancia a diversas condiciones ambientales aun siendo extremas, así como un grado de robustez muy grande, poseen una diversidad de enzimas y vías metabólicas las mismas que le permiten adaptarse y sobrevivir en una extensa serie de nichos ecológicos, así lo detalla Kahlon, 2016 citado por Zeng, Zhanga y Qu, 2019 (p.1). Las *Pseudomonas* se encuentran ampliamente distribuidas reconociéndose como un grupo extenso, con más de 200 especies que se pueden encontrar en diferentes ambientes como suelo, aire, agua, aguas profundas, sedimentos, plantas y animales así lo mencionan Wang y Sun, 2016 citado por Lin et al, 2017 (p.1).

El género *Dietzia* ha sido encontrado y aislado en diferentes especies tanto terrestres como acuáticas, siendo uno de los más significativos los pozos de hidrocarburos como el petróleo, también en zonas contaminadas con el mismo compuesto, debido a sus características peculiares se han hecho estudios donde destacan su capacidad de degradación de alcanos y la producción de biosurfactantes, estas bacterias tienen la capacidad de vivir en un pH superior a 7 incluso en estrés hipersalino (Fang et al, 2017, p.5). Esta bacteria es aeróbica, Gram negativa, un actinomiceto que carece de movimiento tiene forma circular o convexa, es brillante y con un color amarillo o anaranjado, entre sus características se encuentran la facilidad de desarrollarse a temperaturas medianamente bajas, además de emulsionar de manera integral el crudo de

petróleo, degradar compuestos aromáticos e hidrocarburos alifáticos así lo afirma Yamamura et al, 2010 citado por Fang et al, 2017, p.5).

Por otro lado, Li et al, 2012 citado por Lu et al, 2014 nos definen de la siguiente manera “*Dietzia* es un actinomiceto Gram positivos con alto contenido de G + C que es ampliamente distribuido en la naturaleza. Se han encontrado en suelo, sedimento marino, lagos de soda, rizomas de caña, la piel y el tracto intestinal de los peces marinos, alimentos tradicionales coreanos, especímenes clínicos humanos y relacionados con el petróleo crudo”. Debido a sus múltiples usos y beneficios recientemente se han realizado investigaciones encontrando un potencial en aplicaciones industriales como también farmacéuticas, es por ello que se utilizan en diversos campos como el transporte, industrias, metalurgia y medicina (p.1). Recientemente se han dado a conocer las capacidades de este género, algunas cepas son capaces de degradar hidrocarburos saturados, como también algunas otras tienen la peculiar capacidad de degradar compuestos aromáticos como el naftaleno, fenantreno, benzoato y fluoranteno, entre muchos otros afirma Wang, 2011 citado por Yang, Yu y Chen, 2017 (p.1).

El Tereftalato de polietileno (PET) es un poliéster producido a través de policondensación del etilenglicol y el ácido tereftálico, el PET es capaz de resistir atmósferas tanto frías como calientes, es considerado un buen aislante y resistente a la abrasión (Al Salem y Khan, 2015, p.168), un polímero con alto punto de fusión, policristalino, muy resistente al calor y humedad Tseng así lo manifiestan Lo, 2013, Kumar, Sonkawade, Chakarvarti, 2012 citado por Maletic, Cerovic, Dojcilovic, 2019 (p.1). Este es uno de los materiales más utilizados y por ende uno de los mayores contaminantes a nivel mundial. Por su accesibilidad para ser moldeado y sus costos de producción muy bajos se han realizado diversos de estos productos por años acumulándose en el planeta en proporciones monumentales (Gutiérrez, Villavicencio, Villagómez, 2018, p. 942), la industria lo utiliza ampliamente para la fabricación de fibras químicas, películas, botellas entre otros, gracias a sus propiedades químicas y mecánicas, así como su resistencia Tasic et al., 2016, Bui, Satomi y Takahashi, 2018 citado por Wang et al, 2019 (p.224), baja permeabilidad y óptima transparencia. Este material es complicado para degradar aun encontrándose en ambientes húmedos por sufrir menos susceptibilidad al ser atacado por agua y microbios (Thongsong, Kulsetthanchalee y Threepopnatkul, 2017, p.6598). El periodo de duración se considera un margen de permanencia en el medio ambiente de 16 a 48 años.

(Janczak et al., 2018, p.1). En cuanto a la degradación del PET es bastante relacionada con la degradación enzimática, se incluye también la despolimeración por hidrólisis, alcoholisis, glicolisis, amonolisis y aminolisis según lo afirma Teotia et al., 2017 citado por Janczak et al 2018 (p.2).

El plástico está definido como "material que contiene, como ingrediente esencial, una o más sustancias poliméricas orgánicas de gran tamaño peso molecular, es sólido en su estado final y, en algún momento de su fabricación o procesamiento en artículos terminados, puede ser conformado por flujo" Norma ASTM D883 citado por Amaral, 2019 (p.1) lo que quiere decir que se le denomina plásticos a un grupo grande y diverso de polímeros. Las propiedades únicas que poseen los plásticos como su ligero peso, su resistencia y durabilidad son los que hacen que las industrias lo utilicen en mayor proporción como lo explica Thompson et al., 2009 citado por Alimba y Faggio, 2019 (p.64). Por otro lado, Debroas, Mone y Ter Halle (2017) nos menciona que el plástico es un nombre general que hace alusión a diversos polímeros que tienen un peso molecular elevado y al fragmentarse se generan diferentes tamaños de residuos que quedan atrapados en giros y son colonizados por los microorganismos (p.1222), esto hace referencia a las partículas compuestas por estos polímeros que son más pequeñas y en algunos casos diminutas y que sin embargo tienen un impacto negativo alto en el medio. La utilización y posterior eliminación indiscriminada según Bonanno y Bonaca (2018) se transfieren directa o indirectamente a las fuentes hídricas menciona Ley en el 2017 citado por el autor, así como ríos, fuentes de agua pluviales, aguas residuales, entre otros (p.147). Un aspecto importante es que no siempre la producción de estos polímeros son productos limpios, es decir que pueden contener diversos aditivos adaptados con la finalidad de mejorar su rendimiento (McKeen, 2019, p.1). Según la clasificación de plásticos: Téllez (2012, p.14) manifiesta que existen tres grandes grupos, según la clasificación de Gonzáles y Manhini (2003) se dividen de la siguiente manera: Termoeestables: También conocidos como termo rígidos, se utiliza el calor para moldearlos y darles la forma comercial, cuando se enfría este material se quedan con la forma siendo difícil volver a moldearlos. Este tipo de plástico no es fácil de reciclar por su estructura molecular que es compleja de destruir y siendo esto necesario para fundirlo, además al exponerlo al calor para cambiar su estructura, sus propiedades se alteran y en lugar de modificar sus características se queman.

Elastómeros: Por su mismo nombre su principal característica es la elasticidad, poseen una resistencia muy grande a todo tipo de esfuerzos ya sea torsión, tracción o flexión, este tipo de plásticos se deforman cuando se aplica una fuerza externa, pero vuelven a su forma natural cuando se deja de aplicar el esfuerzo, una desventaja es que no son muy tolerantes al calor, ello ocasiona un problema al reciclarlo, pues con una temperatura no muy alta se degrada.

Termoplásticos: Su característica principal es el derretirse al ser expuesto al calor y endurecerse al enfriarse. El reciclaje de estos productos es fácil, pues sus propiedades plásticas no se modifican fácilmente. Una propiedad importante es que son moldeables al calentarse y formar nuevos productos, sin embargo, solo pueden ser reciclados de 5 a 7 veces como máximo pues van perdiendo sus propiedades.

Los mecanismos de degradación del plástico según Vertus et al. (2017, p.2) son los siguientes: La Bio deterioración, es una forma de degradación superficialmente donde las propiedades físicas, químicas y mecánicas son modificadas en un determinado material menciona Popescu et al. en el 2017 citado por el autor, el biodeterioro se da como consecuencia de la acción de los microorganismos que habitan adentro o en la superficie del material según lo afirma Hueck en el 2001 citado por Vertus. La Bio fragmentación se logra cuando las enzimas realizan diversas acciones catalizadoras para romper los polímeros del material plástico generando oligómeros, dimeros o monómeros. La asimilación se realiza cuando las moléculas que han sido trasladadas por el citoplasma en el metabolismo microbiológico se integran menciona Popescu et al. en el 2017 citado por Vertus. La mineralización se genera cuando se alcanza la degradación por completo de las moléculas, es decir cuando se generan el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  nos detalla Lucas et al. en el 2008 citado por el autor.

La Contaminación Ambiental es la causa más grande de enfermedades ambientales a nivel mundial (Landrigan et al., 2019, p.2390), es la “cultura desechable” del paradigma de tomar – hacer – usar y disponer característico del crecimiento económico, la causa raíz de la contaminación, a la vez la describe como una forma de vida materialista donde los recursos existen en demasía y somos libres de utilizarlos para satisfacer nuestras necesidades, son considerados como inagotables pues se cree que nunca se acabaran o por lo menos no pronto así lo afirma Francis, 2015 citado por Landrigan et al., 2019 (p.2391). Un aspecto importante es

la disposición final de los residuos plásticos en rellenos sanitarios y en vertederos abiertos que ocasionan lixiviados tóxicos, ello se debe a que los plásticos, la humedad y las aguas subterráneas interactúan según lo explica Teuten E. L. et al., 2009 citado por Moharir y Kumar (2018, p.9).

La eliminación de estos productos genera una degradación del suelo, esto afecta de manera directa a las especies cercanas ocasionando en muchos casos la muerte, además de la proliferación de compuestos tóxicos en el mar. La disposición final de residuos plásticos de manera inadecuada contamina los acuíferos y vías fluviales, además genera olores y gases nocivos. El Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB) detalla que las piezas diminutas de plástico que son portadores de patógenos facilitan un contagio de enfermedades en el medio en el que habitamos. (Devasahayam, Bhaskar Raju y Mustansar Hussain, 2019, p.635), es por ello que es importante dar un adecuado tratamiento a los residuos y evitar deshacernos de los mismos de manera irresponsable.

La formulación del problema nos genera la siguiente interrogante: ¿Qué tan eficientes son las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* en la degradación del Tereftalato de polietileno, 2019?, lo que conlleva a los siguientes problemas específicos: ¿En qué periodo de tiempo las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* pueden lograr una degradación significativa de Tereftalato de polietileno, 2019?, ¿Cuál de las bacterias *Pseudomonas sp* o *Dietziaceae* obtendrá un porcentaje mayor de degradación del Tereftalato de polietileno, 2019?, ¿Cuáles son las condiciones óptimas de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* para la degradación del Tereftalato de polietileno, 2019?. La justificación del estudio está dada por: justificación teórica: Según Bernal (2010) asegura que se llama justificación teórica cuando la intención es generar reflexión de un conocimiento existente, a la vez se quiere debatir, confrontar o contrastar la teoría descrita existente (p.106). El presente trabajo se justifica en la necesidad de buscar métodos alternativos para la degradación del Tereftalato de polietileno por ser este el producto más utilizado comercialmente gracias a sus propiedades moldeables que permiten la creación de diversos productos además de sus bajos costos que hacen que la sociedad los prefiera sin considerar el daño que puedan ocasionar y que su estadía en la tierra sea por largos periodos de tiempo, ocasionando contaminación ambiental al desintegrarse los componentes presentes en el.

La justificación práctica: debido a la problemática antes señalada, se propone el uso de bacterias para la degradación del PET, al desarrollarse tecnologías limpias, métodos de remediación y uso de microorganismos para la minimización de la contaminación ambiental, estamos promoviendo el cuidado de nuestro medio, además de evitar que se produzcan efectos negativos que repercutirán directamente sobre el ser humano. La justificación social: la presente investigación beneficia a la población en general en el ámbito de los residuos sólidos por la disminución de los mismos, los pobladores se verán beneficiados pues con ello se evita la contaminación del medio en el que habita, así como la propagación de enfermedades. La justificación metodológica: actualmente nuestro planeta contiene grandes cantidades de desechos plásticos, la capacidad de carga de nuestro planeta cada vez es menor y es por ello que se ha puesto especial interés en este tema, mediante investigaciones se han propuesto diferentes microorganismos que permiten degradar el polietileno y sus derivados, sin embargo el porcentaje de degradación en la mayoría son bajos, por ello en la presente investigación se busca proponer dos microorganismos que degradan el tereftalato de polietileno en un porcentaje mayor. A su vez, el presente trabajo permitirá que se siga investigando microorganismos que den resultados favorables y con mayor capacidad de degradación en los plásticos y sus derivados en futuras investigaciones.

El objetivo general es evaluar la eficiencia de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* en la degradación del Tereftalato de polietileno. Además, los objetivos específicos son los siguientes: identificar el periodo de tiempo en el cual las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* pueden lograr una degradación significativa de Tereftalato de polietileno, comparar las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* para obtener el mayor porcentaje de degradación de Tereftalato de polietileno y determinar las condiciones óptimas de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* para la degradación del Tereftalato de polietileno.

La hipótesis general es que las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* son eficientes en la degradación del Tereftalato de polietileno. Por otro lado, las hipótesis específicas son: El periodo de tiempo en el cual las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* logran una degradación significativa Tereftalato de polietileno es corto, la bacteria *Dietziaceae* obtendrá un mayor porcentaje de degradación de Tereftalato de polietileno en comparación con la bacteria *Pseudomonas sp* y las condiciones óptimas de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* serán a una temperatura de 35 a 37°C para la degradación del Tereftalato de polietileno.

## **II. MÉTODO**

### **2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

#### **2.1.1. Tipo de investigación**

El tipo de investigación es APLICADA, según Murillo (2008) citado por Vargas (2009) nos detalla que esta investigación también llamada “investigación práctica o empírica, que se caracteriza porque busca la aplicación o utilización de los conocimientos adquiridos, a la vez que se adquieren otros, después de implementar y sistematizar la práctica basada en investigación” (p.6).

#### **2.1.2. Diseño de la metodología**

El diseño de la investigación es EXPERIMENTAL, según Viñan (2012) nos explica que “Un diseño experimental es algo más que un conjunto de condiciones de prueba; más bien es una secuencia de etapas o actividades que deben realizarse para cumplir con éxito los objetivos que se persiguen” (p.52).

#### **2.1.3. Enfoque de la investigación**

El enfoque de la presente investigación es CUANTITATIVO. La investigación utilizará muestras representativas de determinadas de poblaciones de bacterias, posteriormente se analizarán los datos mediante estadísticas.

### **2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN**

#### **2.2.1. Variables**

- Variables Independiente: Eficiencia de las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae*
- Variables Dependiente: Degradación de Tereftalato de polietileno.



## 2.2.2. Operacionalización de las variables

Eficiencia de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> para la degradación de Tereftalato de polietileno								
Problemas	Objetivo	Hipótesis	Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición
<b>PG:</b> ¿Qué tan eficientes son las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> en la degradación del Tereftalato de Polietileno, 2019?	<b>OG:</b> Evaluar la eficiencia de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> en la degradación del Tereftalato de Polietileno.	<b>HG:</b> Las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> son eficientes en la degradación del Tereftalato de Polietileno	<b>VI:</b> Eficiencia de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i>	<b>-Pseudomonas:</b> “Es un género constituido de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales (...). En general, crecen rápidamente y presentan gran habilidad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos.” (Ruiz, 2007, p.22)  <b>- Dietzia</b> “Se reportó como capaz de sobrevivir en ambientes altamente salinos y alcalinos con diversas fuentes de carbono (...) Las especies no solo son capaces de degradar los alcanos y producir diferentes biosurfactantes, sino también capaz de vivir bajo pH alcalino y estrés hipersalino (Fang et al., 2016, p.4)	Las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> se utilizarán para la degradación del tereftalato de polietileno por sus características específicas que les permiten tolerar los hidrocarburos y sus derivados.	Bacterias <i>Pseudomonas sp</i>	Tiempo de exposición	Minutos
							Población de bacterias	Cantidad de bacterias
						Bacterias <i>Dietziaceae</i>	Tiempo de exposición	Minutos
							Población de bacterias	Cantidad de bacterias
<b>PE1:</b> ¿En qué periodo de tiempo las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> pueden lograr una degradación significativa de	<b>OE1:</b> Identificar el periodo de tiempo en el cual las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> pueden lograr una degradación significativa de	<b>HE1:</b> El periodo de tiempo en el cual las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> logran una degradación significativa de Tereftalato de Polietileno es corto.	<b>VD:</b> Degradación de Tereftalato de Polietileno.	“El tereftalato de polietileno es un polímero sintético termoplástico que se obtiene por polimerización del etileno, (...) es el plástico más común y utilizado en el mundo (Vertus et al., 2017)	El tereftalato de polietileno se utilizará por ser un polímero de uso común a nivel industrial, por lo cual existe una gran cantidad de desechos de este material en nuestro medio, cuya composición no es fácil de degradar lo que significa una contaminación por muchos años del medio ambiente.	Medición de degradación	Pesaje	Peso inicial
							Porcentaje de degradación	Peso final

Tereftalato de Polietileno, 2019?	Tereftalato de Polietileno.							
<b>PE2:</b> ¿Cuál de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> o <i>Dietziaceae</i> obtendrá un porcentaje mayor de degradación del Tereftalato de Polietileno, 2019?	<b>OE2:</b> Comparar las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> para obtener el mayor porcentaje de degradación de Tereftalato de Polietileno.	<b>HE2:</b> la bacteria <i>Dietziaceae</i> obtendrá un mayor porcentaje de degradación de Tereftalato de polietileno en comparación con la bacteria <i>Pseudomonas sp</i> .						
<b>PE3:</b> ¿Cuáles son las condiciones óptimas de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> para la degradación del Tereftalato de Polietileno, 2019?	<b>OE3:</b> Determinar las condiciones óptimas de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> para la degradación del Tereftalato de Polietileno.	<b>HE3:</b> Las condiciones óptimas de las bacterias <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Dietziaceae</i> serán a una temperatura de 35 a 37°C para la degradación del Tereftalato de Polietileno.						

## **2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

### **2.3.1 Población**

La población está conformada por los residuos plásticos compuestos por Tereftalato de polietileno en particular botellas de agua.

### **2.3.2. Muestra**

#### **2.3.2.1. Muestreo aleatorio simple**

Este es un muestreo simple donde se selecciona la muestra sin ningún criterio o propiedad específica, es decir cualquier producto que está compuesto de tereftalato de polietileno tiene la opción de ser elegido, cabe resaltar que estos productos están compuestos por uno de los plásticos más comerciales y con un porcentaje muy alto de residuos a nivel mundial.

#### **2.3.2.2. Criterios para la selección de la muestra**

Se realizó la toma de muestra al azar, se obtuvieron 02 botellas de plástico de agua San Luis de 01 litro del campus de la Universidad César Vallejo Lima Este.

#### **2.3.2.3. Toma de muestra**

##### **2.3.2.3.1. Bacteria *Dietziaceae***

Para la obtención de la bacteria se siguió el protocolo de muestreo de alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), Proyecto TCP/RLA/3014 (A). Con implementos adecuados se recogió 100 gr de excremento fresco de caballo de la Asociación Centro De Esparcimiento Lima (A.C.E.L.) El Potao – Rímac como muestra representativa y se colocó en una bolsa hermética para evitar la contaminación.

##### **2.3.2.3.2. Bacteria *Pseudomona sp***

La bacteria *Pseudomona sp* se adquirió comercialmente según se detalla en el procedimiento experimental.

#### **2.3.2.3.3. Residuos plásticos**

Se recolectó la muestra de tereftalato de polietileno del campus Lima Este de la Universidad César Vallejo, se recogieron 2 botellas de agua San Luis de un litro, se extrajo todo el residuo líquido que contenía y se trasladó al laboratorio de microbiología para la desinfección de las mismas.

#### **2.3.2.4. Materiales para la toma de muestra**

- Guantes de látex esterilizados

#### **2.3.2.5. Materiales para la desinfección de la muestra**

- Etanol frasco de 120 ml  
Laboratorio JENFARMA
- Agua destilada 100 ml

### **2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD**

#### **2.4.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

##### **2.4.1.1. Técnicas**

La técnica utilizada fue la de observación, se utilizó este sentido para la recopilación de muestras de manera simple, sin ningún criterio en específico, solo que el componente principal del producto sea tereftalato de polietileno, así también se recopilaron datos de cada uno de los géneros de las bacterias para conocer su comportamiento y en que medio es más favorable su desarrollo, además, se realizaron fichas de observación para monitorear el avance por tiempo como se muestra en el anexo 1.

##### **2.4.1.2. Insumos**

- Agar nutritivo  
Marca JISO DIAGNOSTIC
- Agar MacConkey  
Marca HIMEDIA MH-081

- Cloruro sódico  
Pureza al 0.9%
- Agua destilada

#### **2.4.1.3. Instrumentos**

- Balanza analítica
- Autoclave Digital
- Estufa de esterilización
- Incubadora

#### **2.4.1.4. Protocolos**

- Selección de la muestra:  
Para la obtención de la muestra se siguió la Guía de muestreo de alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) -Proyecto TCP/RLA/3014 (A)
- Procedimiento experimental:  
Para la obtención de bacterias *Dietziaceae* se siguió la NOM-110-SSA1-1994

### **2.4.2. Validez y Confiabilidad**

#### **2.4.2.1. Validez**

La balanza es un instrumento que se utiliza para medir el peso de un cuerpo o sustancia. En el laboratorio es utilizado con el propósito de ejecutar diversas actividades de control de calidad, para la preparación de mezclas donde la proporción está definida, como también para determinar una densidad o peso específico (Organización Panamericana de la Salud, 2005, p.43).

#### **2.4.2.1. Confiabilidad**

Para asegurar la confiabilidad del pesaje se realizaron dos pesos en balanzas diferentes, la primera del laboratorio de Biotecnología y la segunda del laboratorio de Química, ambos de la UCV, teniendo en ambas balanzas el mismo valor. Por lo tanto, se evidencia que ambos instrumentos se encuentran calibrados funcionando correctamente.

Cabe resaltar que todos los instrumentos han sido utilizados de los laboratorios de la Universidad César vallejo, donde se les realiza el mantenimiento y la calibración correspondiente. A continuación, se detallan los instrumentos con su respectiva marca y modelo.

**Cuadro 1: Detalle de los instrumentos de laboratorio**

<b>Instrumento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Autoclave Digital	Kyntel	
Balanza analítica	Digital Precision	ESJ200-4
Balanza analítica	OHAUS	PA224
Estufa de esterilización	Memmert	Modelo SN 55
Incubadora	Biobase	BJPX-ELM

Fuente: Elaboración propia

## **2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **2.5.1. Bacteria *Dietziaceae***

Para el desarrollo del procedimiento se siguió el protocolo de la NOM-110-SSA1-1994 (FAO, 1995, p. 61), esta es una Norma Oficial de la FAO México de nombre bienes y servicios donde se encuentra el procedimiento para realizar análisis de microorganismos en productos alimenticios, su base en preparar diluciones primarias con el fin de conseguir una repartición homogénea de los microorganismos que se encuentran en la muestra.

#### **2.5.1.1. Preparación de medios de cultivo**

##### **2.5.1.1.1. Medio de cultivo Agar MacConkey**

El Agar MacConkey HIMEDIA MH-081, según las indicaciones del mismo frasco para 1 litro de agua destilada se necesita 49.53 gr de agar, en este caso solo se necesitó 100 ml por lo cual se pesó exactamente 4.954 gr de agar en polvo.

Se disolvió el agar en el agua destilada dentro de un balón de 250 ml, en presencia del mechero con movimientos suaves hasta que llegue a la ebullición.

Luego se colocó en la autoclave a temperatura 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que la solución llegue a los 45°C.

Con ayuda del mechero se colocó el agar en las placas, se desarrolla esta acción cerca al fuego para evitar que se contamine con las bacterias presenten. Se llenó la placa con aproximadamente 25 ml y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

#### **2.5.1.1.2. Medio de cultivo Agar Nutritivo**

El frasco de agar nutritivo adquirido contenido por 100 ml fue suficiente para 4 placas. Se colocó el agar en la autoclave a temperatura 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta los 45°C.

Con ayuda del mechero se colocó el agar en las placas, se desarrolla esta acción cerca al fuego para evitar que se contamine. Se llenó cada placa con aproximadamente 25 ml y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

#### **2.5.1.2. Preparación de la muestra**

Se esterilizaron todos los materiales a utilizar debido a que se está trabajando con bacterias y se quiere evitar la contaminación. Posteriormente se colocó 90 ml de cloruro de sodio al 0.9 % en cada uno de los balones de 100 ml, se obtuvo un total de 8 balones como se muestra en la Figura 1, los mismos que se llevan a la autoclave a temperatura 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. (Ambriz, 2015, p. 16).

**Figura 1: Envases con 90 ml de Solución de cloruro de sodio al 0.9%**



Fuente: Elaboración propia

Se pesaron 10 gr de excremento de caballo y se colocaron en el frasco de 90 ml de cloruro de sodio. Se homogenizó manualmente con 25 movimientos de arriba hacia abajo. La primera solución se rotuló con  $10^{-1}$ , de ésta se recogieron 10 ml a otro frasco con solución salina estéril, se homogenizó manualmente con 25 movimientos de arriba hacia abajo, esta segunda solución se rotuló con  $10^{-2}$ , siguiendo este procedimiento para generar la solución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  como se observa en la Figura 2 y 3. El procedimiento se realizó para el agar nutritivo y el agar MacConkey considerándose 4 balones por tipo de agar. (Ambriz, 2015, p. 16).

**Figura 2: Generación del inóculo**



Fuente: Elaboración propia

**Figura 3: Soluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$**



Fuente: Elaboración propia

### **2.5.1.3. Siembra de bacterias por la técnica de extensión superficial**

Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones (de los balones previamente descritos) para colocarlas en las placas con agar en condiciones de esterilidad, con ayuda del mechero se colocó en medio de la placa, se cerró la placa, el haz de siembra se pasó por el mechero para evitar contaminación, se dejó enfriar, inmediatamente se extendió el inóculo por toda la placa, nótese la Figura 4, luego se esperó a que se absorba para colocarlo en posición invertida. El procedimiento se realizó con las placas de agar nutritivo y agar MacConkey. Cada placa fue rotulada según el inóculo que se utilizó.



**Figura 4: Desarrollo de técnica de expansión superficial**



Fuente: elaboración propia

#### **2.5.1.4. Incubación**

En la incubadora de laboratorio se colocaron las placas a 35°C de temperatura por un total de 5760 minutos (4 días). Se monitoreó visualmente, cada 24 horas, el crecimiento de las bacterias según se detalla en el anexo 2.

Durante los cuatro días de incubación se pudo observar el crecimiento en ambos medios de cultivo, siendo el mayor crecimiento y formación de colonias en el Agar MacConkey, además se observó un cambio de color de rojo a amarillo oscuro lo que significa que las bacterias están consumiéndolo.

#### **2.5.1.5. Siembra de colonias de interés**

Una vez obtenidas las colonias en los diferentes medios de cultivo se demarcaron las que se van a sembrar nuevamente en un medio puro como se muestra en la Figura 5, cada agar tiene una denominación y número diferente.

**Figura 5: Selección de la colonia de interés del agar nutritivo**



Fuente: elaboración propia

#### **2.5.2. Bacteria *Pseudomona sp***

Las bacterias *Pseudomonas sp* se obtuvieron comercialmente, la muestra fue tomada de agua de curtiembre, la misma que fue aislada para la generación de los inóculos y posteriormente sembrada en placas Petri como se observa en la Figura 6.

**Figura 6: Placa Petri con cultivo de bacteria *Pseudomona sp***



Fuente: elaboración propia

### 2.5.3. Tereftalato de polietileno

#### 2.5.3.1. Corte de muestras

Las botellas de plástico fueron cortadas de medidas 2 x 4 cm según Lee, 1991 citado por Meza, 2013 (p. 30), se cortaron en total 30 muestras de una sola botella por lo que la otra no fue necesario utilizarla.

#### 2.5.3.2. Desinfección de muestras

Las muestras fueron sumergidas en un vaso precipitado de 250 ml con 40 ml de etanol, se colocaron en 3 partes es decir 10 muestras se sumergieron los primeros 40 ml, y así sucesivamente. Posteriormente se enjuagaron una a una con agua destilada y se colocó en una placa que fue introducida en la estufa a 130°C por 30 minutos según Lee, 1991 citado por Meza, 2013 (p. 30).

## 2.6. MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos obtenidos han sido ingresados a una base de datos de Excel para posteriormente ser tratados en el programa estadístico Minitab, realizándose el análisis de varianza ANOVA mostrando los resultados mediante tablas y gráficos.

Además, se utilizó una ficha de observación como se demuestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2: Ficha de observación**

PROCESO	INSTRUMENTO	RESULTADO
Cultivo de bacterias	Ficha de Observación	Crecimiento de bacterias
Aislamiento de bacterias	Ficha de Observación	Selección de los géneros específicos
Exposición de las bacterias al PET	Ficha de Observación	Adaptación de las bacterias al medio
Degradación del PET	Pesaje en la balanza analítica	Cantidad de degradación

Fuente: Elaboración propia

- **Software de ingeniería**

La información que se obtuvo durante la experimentación fue procesada en diferentes softwares:

-Excel

-Minitab - ANOVA

- **Prueba de hipótesis**

Se plantearon dos hipótesis, se puede aceptar o rechazar cualquiera de ellas dependiendo de cuál sea el resultado que arrojen las muestras.

H<sub>0</sub>: Las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* degradarán un 30% o más del Tereftalato de Polietileno

H<sub>1</sub>: Las bacterias *Pseudomonas sp* y *Dietziaceae* no degradarán ni un 30% del Tereftalato de Polietileno

## **2.7. ASPECTOS ÉTICOS**

La información presentada es verídica y sin falsedad, los datos han sido analizados e interpretados, siguiendo un protocolo en el desarrollo de la presente investigación, además de la asistencia del personal de laboratorio y cumpliendo con los lineamientos requeridos, en cuanto a la información de otras investigaciones, se ha citado respetando los derechos de autor, cabe resaltar que los resultados obtenidos son reales y que este trabajo no pretende manipular los resultados ni alterarlos, solo cumple con la función de informar, y de servir como apoyo para futuras generaciones contribuyendo a la minimización de impactos negativos en nuestro planeta.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Resultados de la siembra de colonias de interés

En el Agar nutritivo se encontraron mayor presencia de colonias en la disolución  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ . Sin embargo, por presentar mayor cantidad de población en el agar MC se utilizaron las colonias de éste para resembrar.

En el Agar MacConkey se encontraron mayor presencia de colonias en la disolución  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , se procedió a cultivar en una placa de agar MacConkey la colonia expandiéndola por la superficie del agar con el haz de siembra, nótese la Figura 7.

**Figura 7: Resultados de la técnica de extensión superficial**



Fuente: elaboración propia

#### 3.2. Condiciones iniciales

##### 3.2.1. Pesaje de placas

Se realizaron diferentes pesajes, los mismos que se detallan a continuación

##### 3.2.1.1. Pesaje de la muestra de PET

Después de la desinfección y secado de la muestra de PET, se pesaron uno por uno los plásticos, ordenándolos en una superficie desinfectada según el orden de pesaje.

**Cuadro 3: Detalle de los pesos de cada muestra de PET**

<b>Nº PLACA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>PESO INICIAL (g)</b>
<b>1</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2321
<b>2</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2059
<b>3</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2469
<b>4</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2395
<b>5</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2632
<b>6</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2026
<b>7</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.1979
<b>8</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2328
<b>9</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2601
<b>10</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2167
<b>11</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2136
<b>12</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2511
<b>13</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2076
<b>14</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2294
<b>15</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2084
<b>16</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2231
<b>17</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2599
<b>18</b>	<i>Dietziaceae</i>	0.2065
<b>19</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	0.2125
<b>20</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	0.2303
<b>21</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	0.2668

Fuente: elaboración propia

#### 3.2.1.2. Pesaje de la placa con agar y población bacteriana

Cada placa contiene una cantidad de agar aproximada de 20 a 25 ml, la placa contiene el agar y la población bacteriana que ya se ha desarrollado, el orden de las placas está según la primera repetición, segunda repetición, tercera repetición o resembrado respectivamente, se codificó mediante siglas como se muestra en el Cuadro 4.

**Cuadro 4: Detalle del peso de la placa, agar y población bacteriana**

<b>Nº PLACA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>SIGLAS</b>	<b>PESO DE LA PLACA, AGAR Y BACTERIAS (g)</b>
<b>1</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-2	1R10-2	141.765
<b>2</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-3	1R10-3	110.6816
<b>3</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-4	1R10-4	150.4001
<b>4</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-2	2R10-2	86.8846
<b>5</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-3	2R10-3	92.5457
<b>6</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-4	2R10-4	95.0967
<b>7</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-2	3R10-2	88.0427
<b>8</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-3	3R10-3	94.2962
<b>9</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-4	3R10-4	97.3544
<b>10</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-2	A1R10-2	89.4319
<b>11</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R10-3	A1R10-3	94.829
<b>12</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-4	A1R10-4	154.4471
<b>13</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-2	A2R10-2	76.1118
<b>14</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-3	A2R10-3	94.2108
<b>15</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-4	A2R10-4	131.0358
<b>16</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-2	A3R10-2	91.2671
<b>17</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-3	A3R10-3	86.9689
<b>18</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-4	A3R10-4	87.1395
<b>19</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	1° Repetición	S1R	94.2946
<b>20</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	2° Repetición	S2R	92.2527
<b>21</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	3° Repetición	S3R	90.5348

Fuente: elaboración propia

### 3.2.1.3. Pesaje de la placa con agar, población bacteriana y muestra del PET.

En estas placas adicionalmente al peso del agar y de la población bacteriana, se le agrega el PET pesado inicialmente para ser comparado al finalizar el tiempo de exposición, este sería el peso total de todos los componentes por placa como se muestra en el Cuadro 5.

**Cuadro 5: Detalle del peso de la placa, agar, población bacteriana y PET.**

<b>Nº PLACA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>SIGLAS</b>	<b>PESO DE LA PLACA, AGAR, BACTERIAS Y PET (g)</b>
<b>1</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-2	1R10-2	143.4416
<b>2</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-3	1R10-3	112.3575
<b>3</b>	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-4	1R10-4	151.9627
<b>4</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-2	2R10-2	88.6407
<b>5</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-3	2R10-3	94.4333
<b>6</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-4	2R10-4	97.1258
<b>7</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-2	3R10-2	89.8914
<b>8</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-3	3R10-3	96.4945
<b>9</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-4	3R10-4	99.7528
<b>10</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-2	A1R10-2	92.0965
<b>11</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R10-3	A1R10-3	98.5254
<b>12</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-4	A1R10-4	156.7973
<b>13</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-2	A2R10-2	78.1694
<b>14</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-3	A2R10-3	94.2946
<b>15</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-4	A2R10-4	134.8171
<b>16</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-2	A3R10-2	87.2018
<b>17</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-3	A3R10-3	87.3894
<b>18</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-4	A3R10-4	92.079
<b>19</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	1° Repetición	S1R	90.5947
<b>20</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	2° Repetición	S2R	92.3074
<b>21</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	3° Repetición	S3R	92.5727

Fuente: elaboración propia

### 3.2.2. Exposición de las bacterias al PET

Para que la bacteria pueda adecuarse al nuevo componente que se le ha asignado en este caso el PET se ha considerado el tiempo promedio en el que actúan ambas bacterias según los estudios previos de Ambriz en el 2015, Bhatia et al. en el 2014, Gómez y Oliveros en el 2016 por lo que se estimaron 7 días de exposición. Cabe resaltar que estas bacterias son de acción rápida por lo que se puede comprobar su eficiencia durante las primeras horas de exposición.



### 3.3. Condiciones intermedias

En el pesaje intermedio, transcurridas las primeras 96 horas (4 días) se pudo observar una degradación máxima de 29.40% como se observa en la fotografía la muestra de PET está acompañado de bacterias adheridas en la superficie. En el intermedio solo se pesaron las placas de la primera vuelta con diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  para sacar el promedio como se aprecia en el Cuadro 6, debido a que al realizar el pesaje se contamina la placa e imposibilita que se puedan seguir desarrollándose normalmente.

**Figura 8: Bacterias adheridas a la superficie del PET**



Fuente: Elaboración propia

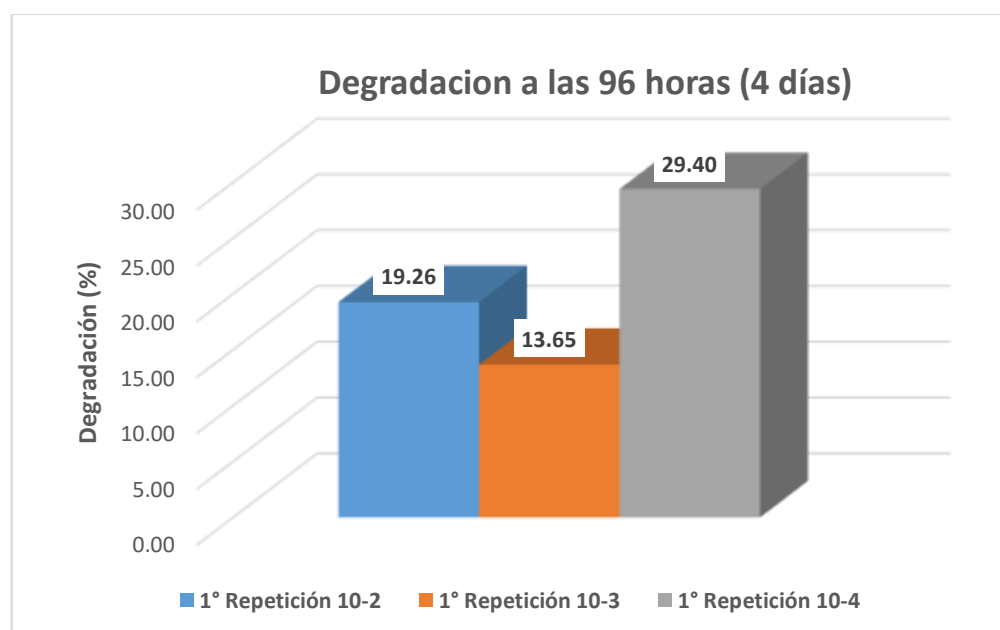
**Cuadro 6: Detalle del peso inicial y final del PET a las 96 horas**

Nº PLACA	GÉNERO	CORRIDA	SIGLAS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN (%)
1	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-2	1R10-2	0.2321	0.1874	19.26
2	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-3	1R10-3	0.2059	0.1778	13.65
3	<i>Dietziaceae</i>	1° Repetición 10-4	1R10-4	0.2469	0.1743	29.40

Fuente: elaboración propia

Luego de ser expuestas las bacterias por un periodo de 96 horas (4 días) el pesaje arrojó como resultado máximo de 29,40%, y mínimo de 13,65%. Siendo el promedio de degradación durante este periodo de tiempo de 20,77% como puede observarse en la Figura 9.

**Figura 9: Degradación de bacterias *Dietziaceae* a las 96 horas**



Fuente: elaboración propia

### 3.4. Condiciones finales

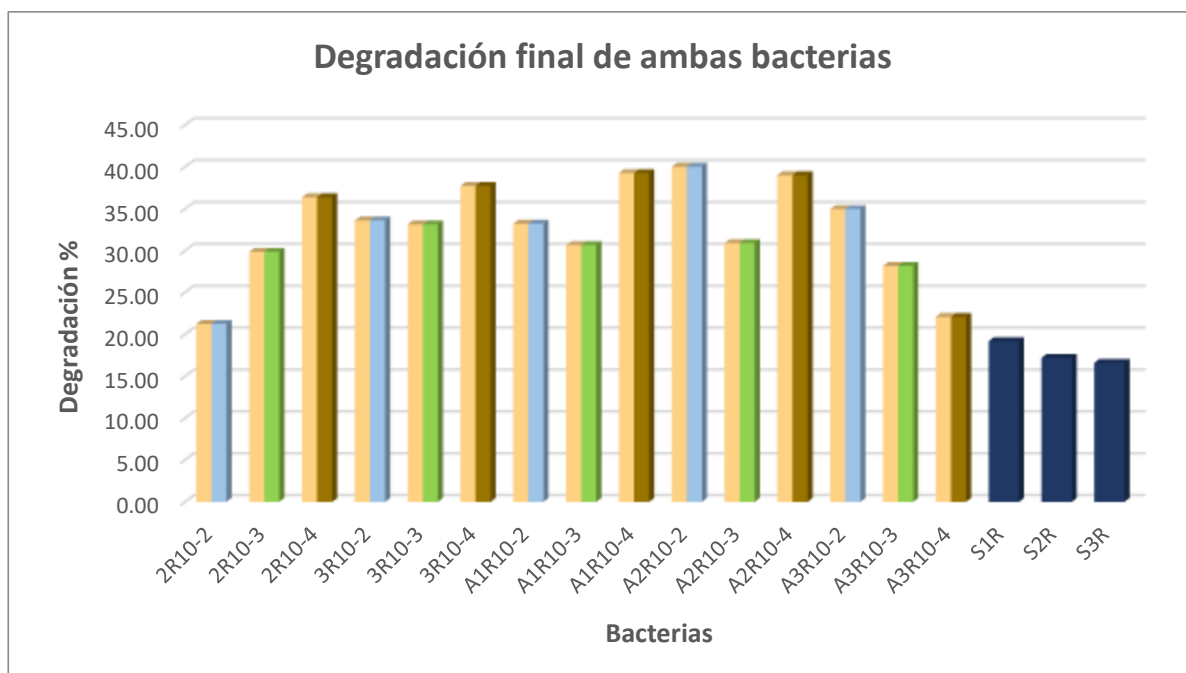
Transcurridos los 7 días de exposición de las bacterias al tereftalato de polietileno se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 7. En este último pesaje no se incluyó a las tres primeras placas pesadas a los 4 días por motivos que al sacar el PET para pesarlo en la balanza analítica la muestra se altera ya sea por las condiciones ambientales, los microorganismos que están en el ambiente o por algún contaminante imposibilitando que puedan desarrollar la degradación de la misma manera, además los valores del pesaje intermedio no se pueden considerar en el porcentaje final por tratarse de diferentes tiempos de degradación.

**Cuadro 7: Detalle final de pesaje del PET a los 7 días**

<b>Nº PLACA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>SIGLAS</b>	<b>PESO INICIAL (g)</b>	<b>PESO FINAL (g)</b>	<b>PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN (%)</b>
<b>4</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-2	2R10-2	0.2395	0.1886	21.25
<b>5</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-3	2R10-3	0.2632	0.1846	29.86
<b>6</b>	<i>Dietziaceae</i>	2° Repetición 10-4	2R10-4	0.2026	0.1289	36.38
<b>7</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-2	3R10-2	0.1979	0.1314	33.60
<b>8</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-3	3R10-3	0.2328	0.1557	33.12
<b>9</b>	<i>Dietziaceae</i>	3° Repetición 10-4	3R10-4	0.2601	0.162	37.72
<b>10</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-2	A1R10-2	0.2167	0.1447	33.23
<b>11</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R10-3	A1R10-3	0.2136	0.1481	30.66
<b>12</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 1R 10-4	A1R10-4	0.2511	0.1525	39.27
<b>13</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-2	A2R10-2	0.2076	0.1245	40.03
<b>14</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-3	A2R10-3	0.2294	0.1585	30.91
<b>15</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 2R 10-4	A2R10-4	0.2084	0.1271	39.01
<b>16</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-2	A3R10-2	0.2231	0.1451	34.96
<b>17</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-3	A3R10-3	0.2599	0.1867	28.16
<b>18</b>	<i>Dietziaceae</i>	Aislamiento 3R 10-4	A3R10-4	0.2065	0.1609	22.08
<b>19</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	1° Repetición	S1R	0.2125	0.1717	19.20
<b>20</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	2° Repetición	S2R	0.2303	0.1907	17.19
<b>21</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	3° Repetición	S3R	0.2668	0.2225	16.60

Fuente: elaboración propia

**Figura 10: Degradación final de PET para ambas bacterias**



Fuente: elaboración propia

De los resultados mostrados de degradación se obtuvo que

- El mayor porcentaje fue de la bacteria *Dietziaceae* A2R10-2 con 40.03%.
- El menor porcentaje fue de las bacteria *Pseudomona sp* S3R con 16.60 %.
- El promedio de degradación de las bacterias *Dietziaceae* fue de 32.68%.
- El promedio de degradación de las bacterias *Pseudomonas sp* fue de 17.67%.

### 3.5. Resultados de análisis estadístico en Minitab

#### ANOVA de un solo factor: PESO INICIAL; PESO FINAL

##### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	2	PESO INICIAL; PESO FINAL

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0.04256	0.042560	69.53	0.000
Error	34	0.02081	0.000612		
Total	35	0.06337			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0247408	67.16%	66.19%	63.18%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
PESO INICIAL	18	0.22900	0.02286	(0.21715; 0.24085)
PESO FINAL	18	0.16023	0.02649	(0.14838; 0.17208)

Desv.Est. agrupada = 0.0247408

## Comparaciones en parejas de Tukey

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
PESO INICIAL	18	0.22900	A
PESO FINAL	18	0.16023	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
PESO FINAL - PESO INICIAL	-0.06877	0.00825	(-0.08553; -0.05201)	-8.34	0.000

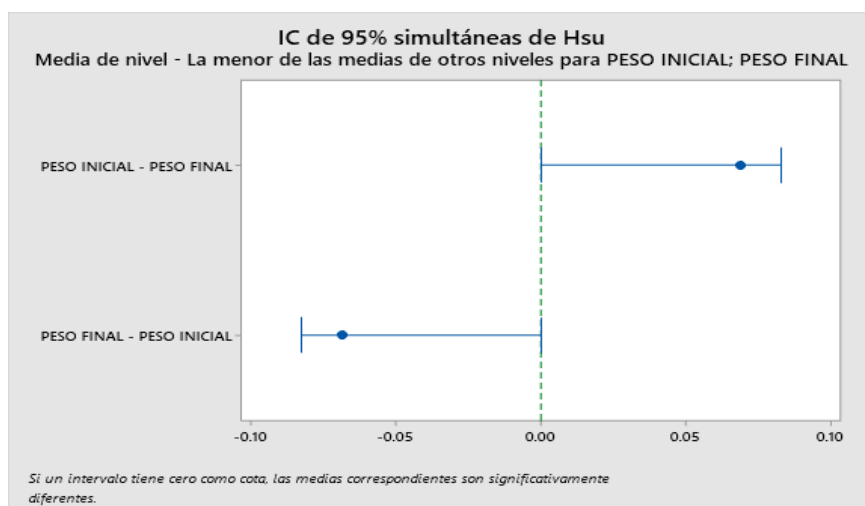
Nivel de confianza individual = 95.00%

## Comparaciones múltiples con el mejor (MCB) de HSU

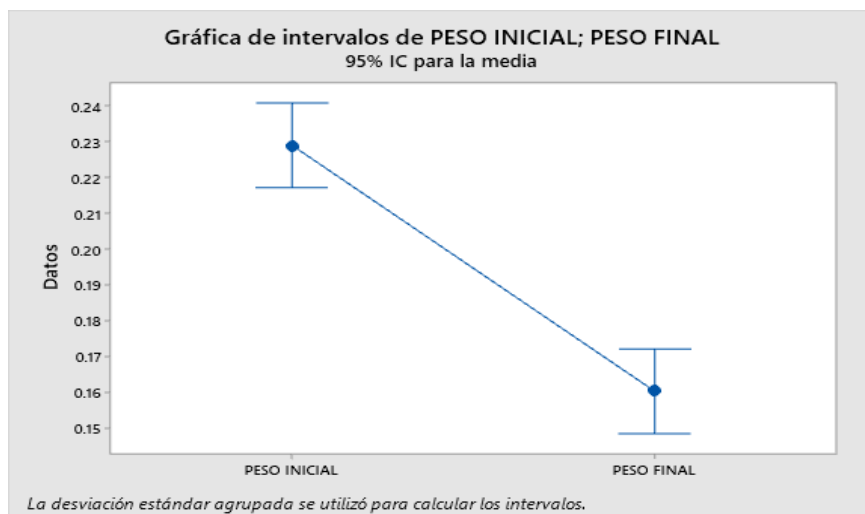
### Pruebas simultáneas de Hsu para la media de nivel - la menor de las medias de otros niveles

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
PESO INICIAL - PESO FINAL	0.06877	0.00825	(0.00000; 0.08271)	8.34	0.000
PESO FINAL - PESO INICIAL	-0.06877	0.00825	(-0.08271; 0.00000)	-8.34	0.000

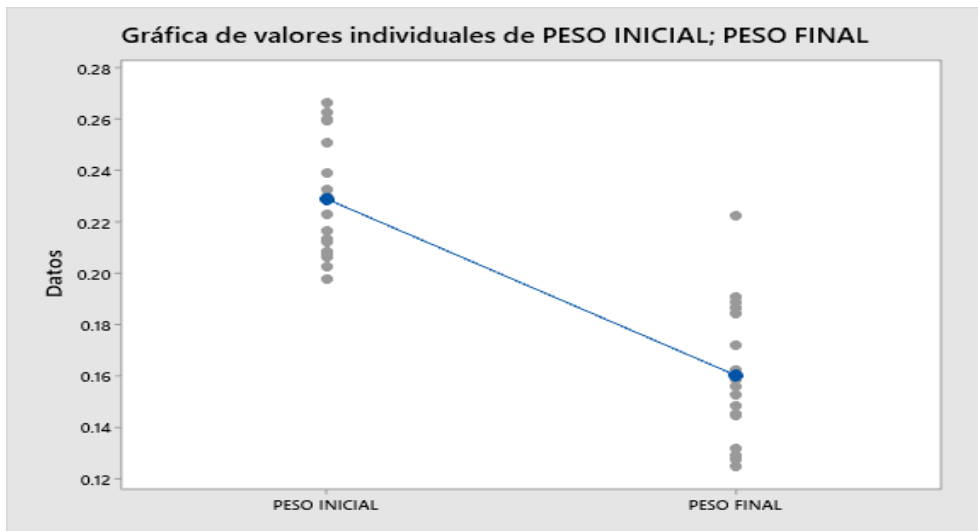
Nivel de confianza individual = 90.00%



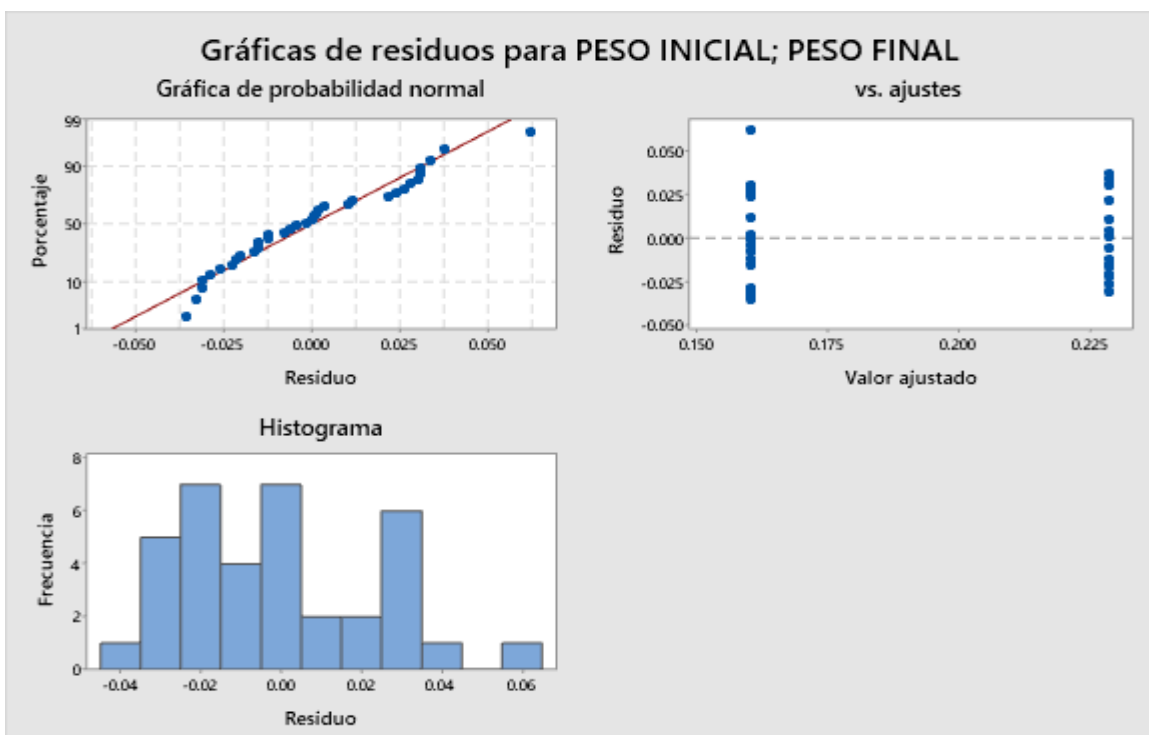
Nota: Se puede observar que el peso final se encuentra hacia el lado derecho del 0, 10 que afirma una diferencia notable del lado izquierdo sin tener valores que coinciden.



Nota: Intervalo de confianza para las predicciones es igual a los promedios con 95% de confiabilidad.



Nota: Se puede apreciar la media y los valores de dispersión en una sola columna para ambos pesos.



Nota: - En el primer gráfico se puede apreciar a los valores cercanos a la línea de normalidad  
 - En el segundo gráfico se cumple con el supuesto de homocedasticidad donde las varianzas de cada peso son constantes.  
 - En el tercer gráfico se aprecia el histograma con valores diferentes.

#### 4. DISCUSIÓN

- Mediante la experimentación se pudo corroborar que ambas especies son potencialmente degradadoras en un periodo corto de tiempo, en especial el género *Dietziaceae* con disoluciones óptimas de  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ , donde los cultivos con estas disoluciones mostraron un mejor crecimiento bacteriano, además la dilución  $10^{-2}$  evidenció mayor porcentaje de degradación, lo que concuerda con la investigación de Ambriz (2015) donde sus resultados arrojaron que la cepa que tuvo como muestra excremento de caballo, con dilución  $10^{-2}$  mostró resultados resaltantes por el estrés a las que fueron sometidas, sin embargo la degradación obtenida en su investigación fue mayor.
- Luego de realizar la exposición al PET se observó la rápida acción de las bacterias, primero al adherirse a la muestra y posteriormente al degradarse, lo cual arrojó una pérdida de peso a los 4 días de exposición como lo afirma Bhatia et al (2014) con un resultado de 17,8%, quienes sometieron sus bacterias por un periodo de 96 horas con resultados similares al de la presente investigación durante los primeros días de exposición.
- Mediante la observación se pudo comprobar que las bacterias actúan adhiriéndose al PET generando cambios morfológicos en su estructura ya sea rajaduras o grietas. En especial en el género *Pseudomonas sp* como evidencia la investigación de Chiellini et al (2006), por lo que se afirma que este género está relacionado con la degradación de diversos compuestos de plástico por su capacidad de acelerar el proceso de degradación.
- Las bacterias de ambos géneros utilizaron el PET como fuente de carbono, esto se produce al haber consumido por completo el agar donde fueron desarrollados, lo cual les obliga acercarse al plástico, ello permite la inserción de grupos hidrofílicos en la muestra, evidenciándose al observar en la superficie a las bacterias en forma de biopelículas como lo expresan Gómez y Oliveros (2016) luego de su experimentación durante 72 horas. Cabe resaltar que mediante su experimentación obtuvieron resultados mayores con un porcentaje final de pérdida de 43,7 mg.



- En cuanto a tiempo de exposición y concentración de la bacteria, difiero con la investigación de Barbarán, Cabanillas y Rubio (2018) quienes afirman que la remoción de PET depende mucho del tiempo que esté expuesto al factor degradación, en estudios citados anteriormente y en el presente estudio se ha comprobado que ambas bacterias son de rápida acción por lo que no necesariamente se deben exponer tiempos prolongados para obtener resultados óptimos.
- Los resultados obtenidos de la especie *Pseudomonas sp* son similares a los de la investigación de Giacomucci et al. (2019), esto se debe a que el género *Pseudomonas* en general ataca las cadenas de polímeros lo que genera una ruptura en el material expuesto y una generación de biopelícula en la superficie logrando así degradarlo.
- Finalmente, la bacteria con mayor porcentaje de degradación fue *Dietziaceae* por sus propiedades para romper enlaces de difícil composición como lo afirma Fang et al., las bacterias son capaces de sobrevivir en diversas condiciones extremas como salinas y alcalinas, de usar ampliamente espectro de carbono, pueden llegar a degradar alcanos, hidrocarburos alifáticos, compuestos aromáticos e incluso emulsionan crudo de petróleo (2016, p.1).

## 5. CONCLUSIONES

- Los resultados de la experimentación permiten afirmar que ambas especies son eficientes en la degradación de tereftalato de polietileno, ambas se adhirieron a la superficie de la muestra logrando generar rupturas y modificaciones en la estructura del PET, los resultados obtenidos son considerados óptimos en el periodo de tiempo de exposición.
- El periodo en el cual se demostró eficiencia degradándose el tereftalato de polietileno fue de 7 días para ambas especies, el cual es considerado corto en comparación con otras investigaciones.
- Al realizar la comparación en los resultados finales se obtuvo que la especie con un porcentaje de degradación mayor fue la bacteria *Dietziaceae* A2R10<sup>-2</sup> con 40.03% mientras que la bacteria *Pseudomonas sp* S1R con mayor degradación obtuvo 19.20%.

- Se ha logrado comprobar que las bacterias *Pseudomonas* sp y *Dietizaceae* se encuentran dentro de los microorganismos con mayor eficiencia en la degradación de plásticos y sus derivados. La temperatura óptima con la que se ha desarrollado es de 35°C.
- Se concluye que, se obtuvieron resultados positivos en cuanto a degradación del tereftalato de polietileno, además el tiempo de exposición fue corto lo que evidencia que ambas especies actúan rápidamente logrando alcanzar los objetivos propuestos.

## 6. RECOMENDACIONES

- Exponer a ambas bacterias por un periodo de tiempo mayor verificando así si se genera una mayor degradación de tereftalato de polietileno.
- Modificar el medio de cultivo de las bacterias, en ambos casos el agar, realizando una preparación casera con componentes que carezcan de carbono en el caso del agar MacConkey contiene lactosa (hidratos de carbono) para que de ésta manera al carecer este componente los microorganismos hambrientos degraden más rápido al estar en contacto con el PET.
- Luego de generar la siembra de colonias de interés se debe esperar un tiempo prudencial donde las bacterias consuman todo el medio de cultivo (agar), esto con la finalidad de que al ser expuestos al PET lo tengan como su única fuente de alimento, manipulando así las bacterias a un mayor consumo de PET.
- Realizar una investigación más profunda sobre la capacidad de estas dos bacterias que han demostrado una eficiencia en lo que respecta a plásticos, pudiendo ser utilizadas en otros campos de interés.
- Replicar la investigación con variaciones en los factores ambientales como lo son temperatura, pH, agitación.

## 7. REFERENCIAS

1. ALIMBA, Chibuisi, FAGGIO, Caterina. *Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile*. [en línea]. 2019 [Fecha de consulta 29 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.001>
2. AL SALEM, Sultan, KHAN, Abdul. *Degradation Kinetic Parameter Determination of Blends Containing Polyethylene Terephthalate (PET) and Other Polymers with Nanomaterials. Poly (Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites*. [en línea]. 2015. [Fecha de consulta 14 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/b978-0-323-31306-3.00009-9](http://sci-hub.tw/10.1016/b978-0-323-31306-3.00009-9)
3. ALANIA, Yorka y PÉREZ, Silvia. *Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de Pseudomonas sp. expuestas a polipropileno*. Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2017.
4. AMBRIZ, Angélica. *Aislamiento e identificación de una cepa nativa de Dietzia Sp, para uso en la degradación de ácido tereftálico*. Tesis (ingeniero ambiental). México: Instituto Politécnico Nacional, 2015.
5. AMARAL, Linda. *Plastics: Colonization and Degradation. Reference Module in Life Sciences*. [en línea]. 2019 [Fecha de consulta 28 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90685-X>
6. AZAMI, Azura [et al]. Purification and characterization of new bio-plastic degrading enzyme from Burkholderia cepacia DP1, Protein Expression and Purification [en línea]. 2018, [Fecha de consulta: 10 de junio de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.008>.
7. BARBARAN, Hellen, CABANILLAS, Lilian y RUBIO, Yoselin. *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio*. Tesis (Ingeniería ambiental). Perú: Universidad César Vallejo, 2018.
8. BATHIA, Mayuri [et al]. *Implications of a novel Pseudomonas species on low density polyethylene biodegradation: an in vitro to in silico approach*. [en línea]. 2014, [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2019].

Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1186/2193-1801-3-497>

9. BELEN, Alexandra. *Diseño estadístico experimental para el estudio de la respuesta del maíz (zea mays l.) a la aplicación edáfica complementaria de tres tipos de abono sintético a dos dosis en la comunidad de Peñas, Canton, Tiwintza, provincia de Morona Santiago*. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2012.
10. BERNAL, César. *Metodología de la investigación. Tercera edición*. Pearson Educación [en línea]. 2010. [Fecha de consulta: 29 de junio de 2019].  
ISBN: 978-958-699-128-5
11. BONANNO, Giuseppe, BONACA, Martina. *Ten inconvenient questions about plastics in the sea. Environmental Science & Policy*. [en línea]. 2018. [Fecha de consulta 01 de mayo del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.envsci.2018.04.005](https://sci-hub.tw/10.1016/j.envsci.2018.04.005)
12. CHEN, Weiwei [et al]. *High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium Dietzia species CN-3*. [en línea]. 2017 [Fecha de consulta 22 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.ibiod.2017.01.029](https://sci-hub.tw/10.1016/j.ibiod.2017.01.029)
13. CHIELLINI, E. [et al]. *Oxo-biodegradable carbon backbone polymers e Oxidative degradation of polyethylene under accelerated test conditions*. [en línea]. 2006 [Fecha de consulta 25 de noviembre del 2019].  
Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.022>
14. DEBROAS, Didier, MONE, Anne, TER HALLE, Alexandra. *Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders*. [en línea]. 2017 [Fecha de consulta 20 de abril del 2019].  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.059>
15. DEVASAHAYAM, Sheila, BHASKAR RAJU, Guntamadugu, MUSTANSAR, Chaudhery. *Utilization and recycling of end of life plastics for sustainable and clean industrial processes including the iron and steel industry* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 03 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.08.002>

16. DODD, CER. *Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology* [en línea]. 2014. [Fecha de consulta 09 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00282-2>
17. FAO. *NOM-110-SSA1-1994: Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. 1995. [Fecha de consulta 02 de septiembre del 2019].  
Disponible en: <http://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC013544/>
18. FAO. *Guía para muestreo de alimentos. Proyecto TCP / RLA / 3014 (A) Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de la calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América Central, Cuba, México, Panamá y República Dominicana*. 1997. [Fecha de consulta 02 de septiembre del 2019].  
Disponible en: [https://www.academia.edu/24018626/Guia\\_para\\_muestreo\\_de\\_alimentos\\_FAO](https://www.academia.edu/24018626/Guia_para_muestreo_de_alimentos_FAO)
19. FANG, Hui [et al]. *The complete genome of Dietzia timorensis ID05-A0528T revealed the genetic basis for its saline-alkali tolerance*. [en línea]. 2017 [Fecha de consulta 22 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.jbiotec.2016.10.015](http://sci-hub.tw/10.1016/j.jbiotec.2016.10.015)
20. GIACOMUCCI, Lucia [et al]. *Polyvinyl chloride biodegradation by Pseudomonas citronellolis and Bacillus flexus*. [en línea]. 2019 [Fecha de consulta 25 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.005>
21. GOMEZ, Jhonathan y OLIVEROS, Cleomary. *Polyethylene terephthalate Biodegradation by microorganisms isolated from sites of final disposal of solid waste, Táchira, Venezuela*. 2016. Revista científica [en línea]. [Fecha de consulta: 24 de julio de 2019]  
ISSN 2244-7334
22. GUTIERREZ, Jazmín. *Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos*. Tesis (Bióloga). México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
23. GUTIERREZ, José, FLORES, Lérica y VILLAGOMEZ, Julio. *Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos*. Revista de divulgación científica [en línea]. 2018. [Fecha de consulta: 29 de junio de 2019].  
ISSN 2395-9797

24. HAN, Xiuyan, SUN, Tao y FENG, Qing. *Study on environmental pollution loss measurement model of energy consumption emits and its application in industrial parks* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 23 de mayo de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.002>
25. HVIDSTEN, Ina [et al]. *Lipids of Dietzia sp. A14101. Part I: A study of the production dynamics of surface-active compounds* [en línea]. 2017 [Fecha de consulta 25 de abril del 2019].  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.006>
26. JANCZAK, Katarzyna [et al]. *Use of rhizosphere microorganisms in the biodegradation of PLA and PET polymers in compost soil.* [en línea]. 2018 [Fecha de consulta 21 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.017>
27. LAMA, José y MATOS, Renzo. *Estudio integral y diseño preliminar para la implementación de una línea de procesamiento de material reciclable plástico tipo PET en el marco de un plan de manejo municipal selectivo de residuos sólidos urbanos.* Tesis (Ingeniero químico). Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, 2004.
28. LANDRIGAN, Philip. *Pollution and children's health* [en línea]. 2019 [Fecha de consulta 29 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.scitotenv.2018.09.375](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.375)
29. LIN, Xuezheng [et al]. *Complete genome sequence of a denitrifying bacterium, Pseudomonas sp. CC6-YY-74, isolated from Arctic Ocean sediment* [en línea]. 2017. [Fecha de consulta: 15 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2017.05.007>
30. LU, Bo [et al]. *A critical combination of operating parameters can significantly increase the electrotransformation efficiency of a gram-positive Dietzia strain. Journal of Microbiological Methods.* [en línea]. 2014. [Fecha de consulta 14 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.mimet.2014.05.015](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.015)
31. MALETIC, Slavica, CEROVIC, Dragana, DOJCILOVIC, Jablan. *A study of structural and spectral properties of ion-beam modified polyethylene terephthalate membrane* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 08 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.12.053>

32. MCKEEN, Laurence. *The Effect of UV Light and Weather on Plastics and Elastomers (Fourth Edition)* [en línea]. 2019, N° 4 [Fecha de consulta 09 de abril del 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816457-0.00001-0>  
ISBN: 978-0-12-816457-0
33. MEZA, Mauricio. *Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina*. Tesis (Ingeniero en biotecnología). Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército, 2013.
34. MOHARIR, Rucha, KUMAR, Sunil. *Challenges Associated with Plastic Waste Disposal and Allied Microbial Routes for its Effective Degradation: A Comprehensive Review, Journal of Cleaner Production* [en línea]. 2018. [Fecha de consulta 08 de abril del 2019].  
Disponible en: [sci-hub.tw/10.1016/j.jclepro.2018.10.059](https://sci-hub.tw/10.1016/j.jclepro.2018.10.059)
35. MUNIZ, Marina [et al]. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 25 de junio de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.064>
36. MUÑOZ, Susan. *Degradación de polímeros de interés industrial utilizando una mezcla de Pseudomonas aeruginosa, Cladosporium sp y Alternaria sp*. Chile: Universidad Santo Tomás, 2014.
37. NOVÁKOVÁ, Kateřina, ŠEPS, Karel, ACHTEN, Henri. *Experimental Development of a Plastic Bottle Usable as a Construction Building Block Created Out of Polyethylene Terephthalate: testing PET* [en línea]. 2017. [Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobbe.2017.05.015>
38. Organización Panamericana de la Salud. Área de Tecnología y Prestación de Servicios de Salud. Unidad de Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnologías en Salud. *Manual de mantenimiento para Equipo de Laboratorio*. 2005. [Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2019].  
Disponible en: [http://www.exactas.unlp.edu.ar/uploads/docs/manual\\_de\\_mantenimiento.pdf](http://www.exactas.unlp.edu.ar/uploads/docs/manual_de_mantenimiento.pdf)  
ISBN 9275325901

39. ROSS, Michael y PAWLINA, Wojciech. *Histología. Texto y Atlas a color con biología celular y molecular 5ta edición*. [en línea]. 2008. [Fecha de consulta: 20 de junio de 2019].  
ISBN 978-950-06-0435-2
40. RUIZ, Lidia. *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis (Doctoral). Barcelona: Universidad de Barcelona, 2007.
41. SYRANIDOU, Evdokia [et al]. *Biodegradation of mixture of plastic films by tailored marine consortia* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 10 de agosto de 2019].  
  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.04.078>
42. SKOOG, Douglas y WEST, Donald. *Introducción a la química analítica* [en línea]. 2002. [Fecha de consulta: 19 de junio de 2019].  
ISBN 84-291-7511-3
43. TELLEZ, Alejandra. *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá*. Tesis (Magíster en medio ambiente y desarrollo). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Económicas, 2012.
44. THONGSONG, Weerayut, KULSETTHANCHALEE, Chanin, THREEPOP NATKUL, Poonsub. *Effect of polybutylene adipate-co-terephthalate on properties of polyethylene terephthalate thin films* [en línea]. 2017. [Fecha de consulta: 08 de septiembre de 2019].  
  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.173>
45. VARGAS, Zoila. *La investigación aplicada: una forma de conocer las realidades con evidencia científica*. Vol. 33. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2009.  
ISSN: 0379-7082.
46. VERTUS, Dominique [et al]. *Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación en Cerro Patacon*. [en línea]. 2017. Revista de divulgación científica [Fecha de consulta: 23 de junio de 2019].



47. WANG, Dan [et al]. *A facile evaluation on melt crystallization kinetics and thermal properties of low-density polyethylene (LDPE)/Recycled polyethylene terephthalate (RPET) blends* *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 08 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.05.002>
48. WANG, Menglei [et al]. *Isolation of formaldehyde-degrading bacteria and the evaluation of the degradation characteristics* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 20 de junio de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.027>
49. WANG, Xing [et al]. *Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel Dietzia strain* [en línea]. 2011. [Fecha de consulta: 01 de junio de 2019].  
Disponible en: [10.1016/j.biortech.2011.06.009](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.009)
50. YANG, Shanjun, YU, Mingjia, CHEN, Jianming, *Draft genome analysis of Dietzia sp. 111N12-1, isolated from the South China Sea with bioremediation activity. Braz J Microbiology* [en línea]. 2017. [Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2019].  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.029>
51. ZENG, Yin-Xin, ZHANG, Yi-He, QU, Jiang-Yong. *Complete genome of Pseudomonas sp. DMSP-1 isolated from the Arctic seawater of Kongsfjorden, Svalbard* [en línea]. 2019. [Fecha de consulta: 06 de octubre de 2019].  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.004#>



## 8. ANEXOS

### 1. Ficha de Observación



Nº	Tipo de bacteria	Observaciones	Análisis Inicial	Análisis Final	%
1					
2					
3					
4					
5					

### 2. Comparación del crecimiento de las bacterias *Dietzia*



**DÍA 1**



Agar nutritivo	Agar MacConkey
	
<b>Día 1: Presencia de pequeños círculos (bacterias).</b>	<b>Día 1: Presencia de círculos medianos (bacterias)</b>

## DÍA 2

Agar nutritivo	Agar MacConkey
	
<p><b>Día 2: Presencia de colonias en formación.</b></p>	<p><b>Día 2: Presencia de colonias formadas y bastante juntas</b></p>

## DIA 3

Agar nutritivo	Agar MacConkey
	
<p><b>Día 3: Presencia de colonias bien formadas</b></p>	<p><b>Día 3: Presencia de colonias bien formadas y abundantes, nótese un cambio de color en parte del agar.</b></p>

Agar nutritivo	Agar MacConkey
	
Día 4: Presencia de colonias bien formadas, no se observa mucha diferencia entre el 3 y 4 día.	Día 4: Se observa un cambio de color en el agar, las colonias estan bien formadas y abundantes.

Fuente: Elaboración propia

### 3. Procedimiento en laboratorio para obtención de bacterias

#### Pesaje del Agar MacConkey



#### Dilución del agar MacConkey en agua destilada



**Procedimiento de plaqueo del  
Agar MacConkey**



**Insumos en la Autoclave para  
esteriliación**



**Pesaje del excremento de caballo  
en la balanza analítica**



**Solución  $10^{-1}$  (inóculo madre)  
del excremento de caballo**



**Toma del inóculo  $10^{-1}$  para generar la solución  $10^{-2}$**



**Soluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$**



**Placas de agar MacConkey para siembra de bacterias**



**Siembra por la técnica de extensión superficial en agar MacConkey**





#### **4. Procedimiento en laboratorio para obtención de muestras de PET**

**Botella de PET a ser cortada luego extracción del líquido**



**Medición de 2 x 4 cm para corte de la muestras de PET**



**Muestras de PET cortadas**



**Desinfección de muestras de PET**



## 5. Pesaje en la balanza analítica

**Pesaje de las muestras de  
PET**



**Pesaje de la placa, agar y población  
bacteriana**



**Pesaje de la placa, agar, población bacteriana y PET**

